

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003787

International filing date: 04 March 2005 (04.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-060426
Filing date: 04 March 2004 (04.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 4 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 6 0 4 2 6

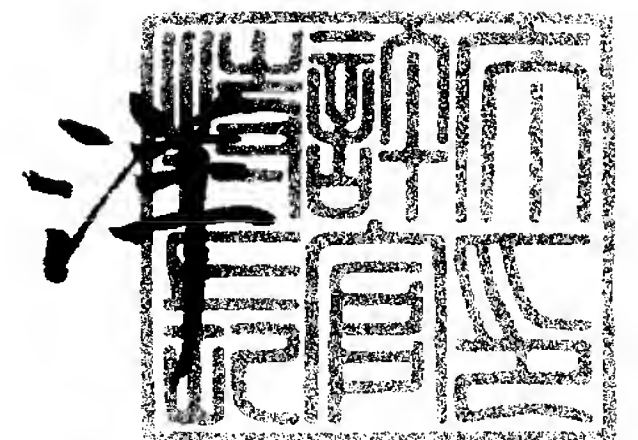
パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
J P 2 0 0 4 - 0 6 0 4 2 6
The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

出 願 人
Applicant(s): 明 治 製 菓 株 式 会 社

2 0 0 5 年 4 月 1 3 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】	特許願
【整理番号】	14685601
【提出日】	平成16年 3月 4日
【あて先】	特許庁長官殿
【国際特許分類】	C12N 15/54
【発明者】	
【住所又は居所】	埼玉県坂戸市千代田五丁目3番1号 明治製菓株式会社 ヘルス・バイオ研究所内
【氏名】	中 村 博 文
【発明者】	
【住所又は居所】	埼玉県坂戸市千代田五丁目3番1号 明治製菓株式会社 ヘルス・バイオ研究所内
【氏名】	中 根 公 隆
【発明者】	
【住所又は居所】	埼玉県坂戸市千代田五丁目3番1号 明治製菓株式会社 ヘルス・バイオ研究所内
【氏名】	窪 田 英 俊
【特許出願人】	
【識別番号】	000006091
【住所又は居所】	東京都中央区京橋二丁目4番16号
【氏名又は名称】	明治製菓株式会社
【代理人】	
【識別番号】	100075812
【弁理士】	
【氏名又は名称】	吉 武 賢 次
【選任した代理人】	
【識別番号】	100091487
【弁理士】	
【氏名又は名称】	中 村 行 孝
【選任した代理人】	
【識別番号】	100094640
【弁理士】	
【氏名又は名称】	紺 野 昭 男
【選任した代理人】	
【識別番号】	100107342
【弁理士】	
【氏名又は名称】	横 田 修 孝
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	087654
【納付金額】	21,000円
【提出物件の目録】	
【物件名】	特許請求の範囲 1
【物件名】	明細書 1
【物件名】	要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

6 2 番、1 2 2 番、1 2 8 番、1 6 5 番、2 2 1 番、3 9 5 番、および 5 5 0 番の少なくとも 1 つのアミノ酸残基において変異を有する配列番号 2 に記載のアミノ酸配列またはその相同体からなる、 β -フルクトフラノシダーゼ変異体。

【請求項 2】

変異が、置換である、請求項 1 に記載の変異体。

【請求項 3】

置換が、

6 2 番のアミノ酸残基の、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群から選択される酸性アミノ酸への置換、

1 2 2 番のアミノ酸残基の、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、およびバリンからなる群から選択されるアミノ酸への置換、

1 2 8 番のアミノ酸残基の、アスパラギンおよびグルタミンからなる群から選択されるアミノ酸への置換、

1 6 5 番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、およびチロシンからなる群から選択される芳香族アミノ酸への置換、

2 2 1 番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、およびチロシンからなる群から選択される芳香族アミノ酸への置換、

3 9 5 番のアミノ酸残基の、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、およびバリンからなる群から選択されるアミノ酸への置換、および

5 5 0 番のアミノ酸残基の、セリンおよびスレオニンからなる群から選択されるヒドロキシアミノ酸への置換

である、請求項 2 に記載の変異体。

【請求項 4】

配列番号 2 に記載のアミノ酸配列およびその相同体の、1 7 0 番、3 0 0 番、3 1 3 番、および 3 8 6 番目の少なくとも 1 つのアミノ酸残基において、更に変異を有する、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の変異体。

【請求項 5】

変異が置換である、請求項 4 に記載の変異体。

【請求項 6】

置換が、

1 7 0 番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、およびチロシンからなる群から選択される芳香族アミノ酸への置換、

3 0 0 番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシンおよびバリンからなる群から選択されるアミノ酸への置換、

3 1 3 番のアミノ酸残基の、リジン、アルギニン、およびヒスチジンからなる群から選択される塩基性アミノ酸への置換、および

3 8 6 番のアミノ酸残基の、リジン、アルギニン、およびヒスチジンからなる群から選択される塩基性アミノ酸への置換

である、請求項 5 に記載の変異体。

【請求項 7】

4 0 番、3 7 9 番、および 3 8 1 番の少なくとも 1 つのアミノ酸残基において変異を有する配列番号 2 に記載のアミノ酸配列またはその相同体からなる、 β -フルクトフラノシダーゼ変異体。

【請求項 8】

変異が、置換である、請求項 7 に記載の変異体。

【請求項 9】

置換が、

4 0 番のアミノ酸残基の、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群から選択され

る酸性アミノ酸への置換、

３７９番のアミノ酸残基の、システインへの置換、および

３８１番のアミノ酸残基の、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、およびバリンからなる群から選択されるアミノ酸への置換

である、請求項８に記載の変異体。

【請求項１０】

請求項１～９のいずれか一項に記載の β -フルクトフラノシダーゼ変異体をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項１１】

請求項１０に記載のポリヌクレオチドを含んでなる、組換えベクター。

【請求項１２】

請求項１１に記載の組換えベクターを含んでなる、形質転換体。

【請求項１３】

請求項１２に記載の形質転換体または請求項１～９のいずれか一項に記載の β -フルクトフラノシダーゼ変異体とスクロースを接触させる工程を含んでなる、フラクトオリゴ糖の製造法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 β －フルクトフラノシダーゼ変異体

【発明の属する技術分野】

【0001】

本発明は、ショ糖から特定のフラクトオリゴ糖を選択的かつ効率的に生成する β －フルクトフラノシダーゼ変異体に関し、より詳細には、1－kestoseを効率的に生産する β －フルクトフラノシダーゼ変異体およびnystoseを効率的に生産する β －フルクトフラノシダーゼ変異体に関する。

【従来の技術】

【0002】

一般にフラクトオリゴ糖は、ショ糖のフルクトースに1から3分子のフルクトースがC1とC2の位置で β 結合しているオリゴ糖であり、難消化性の糖質で、腸内のビフィズス菌増殖促進作用、コレステロールなどの脂質代謝改善作用、難う蝕性、ミネラル吸収促進作用などの優れた生理機能を有することが見出されている。フラクトオリゴ糖は、天然には広く植物に分布しており、例えばタマネギ、アスパラガス、キクイモなどに含まれていることが知られているが、最近では、微生物由来の β －フルクトフラノシダーゼの転移反応を利用してショ糖から大量に製造する技術が確立され、工業的に生産されている。現在フラクトオリゴ糖の工業的生産に利用されている β －フルクトフラノシダーゼは、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 由来の菌体内 β －フルクトフラノシダーゼを利用している。

【0003】

当該 β －フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子は、WO97/34004号公報（特許文献1）に開示されている。しかし、当該 β －フルクトフラノシダーゼは、1－kestose、nystose、1－フルクトシルnystoseの混合物としてフラクトオリゴ糖を生成するため、フラクトオリゴ糖はオリゴ糖混合物のシロップあるいは粉末として製造、提供されている。単一成分として、1－kestoseあるいはnystoseを選択的かつ効率的に生産する β －フルクトフラノシダーゼが得られれば、次のような有用性が存在する。すなわち、1－kestoseあるいはnystoseを高純度に精製し、結晶化させることによって、フラクトオリゴ糖の生理機能を保持したまま、物性および加工特性上優れた特性を有する単一成分の結晶フラクトオリゴ糖を製造することが可能となる。

【0004】

一方、ショ糖を原料とした結晶1－kestoseの工業的製造法は、例えば、WO97/21718号公報（特許文献2）に開示されている。すなわち、 β －フルクトフラノシダーゼをショ糖に作用させて1－kestoseに生成させ、クロマト分離法により1－kestoseを純度80%以上に生成した後、これを結晶化原液として純度95%以上の結晶1－kestoseを得る方法である。この方法に用いられる酵素の特性として、ショ糖から1－kestoseへの変換率が高いこと、nystoseの生成量が低いことが工業的製造法において求められている。また同様にnystoseを単一成分として製造する場合には、nystoseへの変換率が高いこと、1－フルクトシルnystoseの生成量が低いことが工業的製造法において求められている。

【特許文献1】 WO97/34004号公報

【特許文献2】 WO97/21718号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、フラクトオリゴ糖の単一成分、例えば1－kestoseあるいはnystoseの製造に適するように反応特性が改善された β －フルクトフラノシダーゼ変異体およびその遺伝子の提供をその目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、配列番号2のアミノ酸配列中の特定位置のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換した β -フルクトフラノシダーゼ変異体が、1-kestoseあるいはnystoseの製造に適する反応特性を有していることを見出した。

【0007】

すなわち本発明の第一の態様によれば、62番、122番、128番、165番、221番、395番、および550番の少なくとも1つのアミノ酸残基において変異を有する配列番号2に記載のアミノ酸配列またはその相同体からなる、 β -フルクトフラノシダーゼ変異体およびその変異体をコードするポリヌクレオチドが提供される。本発明の第一の態様による変異体によれば、1-kestoseの効率的な製造が可能となる。

【0008】

本発明の第二の態様によれば、40番、379番、および381番の少なくとも1つのアミノ酸残基において変異を有する配列番号2に記載のアミノ酸配列またはその相同体からなる、 β -フルクトフラノシダーゼ変異体およびその変異体をコードするポリヌクレオチドが提供される。本発明の第二の態様による変異体によれば、nystoseの効率的な製造が可能となる。

【0009】

本発明による β -フルクトフラノシダーゼ変異体を用いれば、フラクトオリゴ糖を製造する際の酵素反応液の糖組成を改善することが可能となり、フラクトオリゴ糖の単一成分の効率的な製造が可能となる。すなわち、本発明による β -フルクトフラノシダーゼ変異体によれば、従来と比較して簡便に、かつ安価にフラクトオリゴ糖の単一成分の工業的製造が可能となる点で有利である。

【発明の具体的説明】

【0010】

β -フルクトフラノシダーゼ変異体およびその遺伝子

本発明による第一および第二の態様による変異体は、配列番号2に記載のアミノ酸配列およびその相同体の特定のアミノ酸残基の少なくとも1つに変異が導入されてなるものである。

【0011】

変異が導入されるアミノ酸残基の位置は、配列番号2のアミノ酸配列のアミノ酸残基番号と対応する。

【0012】

本発明において「変異」とは、置換、欠失、および挿入を意味する。

【0013】

「置換」とは、特定のアミノ酸残基が取り除かれ、かつ他のアミノ酸残基が同じ位置に挿入されていることをいう。

【0014】

「欠失」とは、特定のアミノ酸残基が取り除かれていることを意味する。

【0015】

「挿入」とは、特定のアミノ酸残基の前にあるいは後ろに、1個または複数個のアミノ酸残基が挿入されていることをいい、具体的には、特定のアミノ酸残基の α -カルボキシル基あるいは α -アミノ基に、1個または複数個、好ましくは、1個ないし数個、のアミノ酸残基が結合することをいう。

【0016】

配列番号2に記載のアミノ酸配列およびその相同体に導入される特定変異の数は特に限定されないが、1個ないし数個、あるいは1または2個であることができる。

【0017】

本発明の第一および第二の態様による変異体において、配列番号2に記載のアミノ酸配列およびその相同体に導入される変異は、好ましくは、置換である。

【0018】

本発明の第一の態様による変異体において、配列番号2に記載のアミノ酸配列およびそ

の相同体の62番、122番、128番、165番、221番、395番、および550番のアミノ酸残基に導入される置換は、好ましくは、下記の通りである。

【0019】

62番のアミノ酸残基の、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群から選択される酸性アミノ酸、特にグルタミン酸、への置換。

【0020】

122番のアミノ酸残基の、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、およびバリンからなる群から選択されるアミノ酸、特にメチオニン、への置換。

【0021】

128番のアミノ酸残基の、アスパラギンおよびグルタミンからなる群から選択されるアミノ酸、特にアスパラギン、への置換。

【0022】

165番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、およびチロシンからなる群から選択される芳香族アミノ酸、特にフェニルアラニン、への置換。

【0023】

221番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、およびチロシンからなる群から選択される芳香族アミノ酸、特にチロシン、への置換。

【0024】

395番のアミノ酸残基の、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、およびバリンからなる群から選択されるアミノ酸、特にロイシン、への置換。

【0025】

550番のアミノ酸残基の、セリンおよびスレオニンからなる群から選択されるヒドロキシアミノ酸、特にセリン、への置換。

【0026】

本発明の第一の態様による変異体においては、配列番号2に記載のアミノ酸配列およびその相同体の、170番、300番、313番、および386番の少なくとも1つのアミノ酸残基において、更に変異、好ましくは、置換、を有していてもよい。これらの変異を有するβ-フルクトフラノシダーゼは、1-ケストースを選択的にかつ効率的に生産できる点で有利である（例えば、WO99/13059号公報参照）。

【0027】

本発明の第一の態様による変異体において、配列番号2に記載のアミノ酸配列およびその相同体の170番、300番、313番、および386番に導入することができる置換は、好ましくは、下記の通りである。

【0028】

170番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、およびチロシンからなる群から選択される芳香族アミノ酸、特にトリプトファン、への置換。

【0029】

300番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシンおよびバリンからなる群から選択されるアミノ酸への置換。

【0030】

313番のアミノ酸残基の、リジン、アルギニン、およびヒスチジンからなる群から選択される塩基性アミノ酸、特にリジンまたはアルギニン、への置換。

【0031】

386番のアミノ酸残基の、リジン、アルギニン、およびヒスチジンからなる群から選択される塩基性アミノ酸、特にリジン、への置換。

【0032】

本発明の第一の態様による変異体において、配列番号2に記載のアミノ酸配列およびその相同体に導入することができる好ましい多重変異としては、165番のアミノ酸残基と、300番のアミノ酸残基と、313番のアミノ酸残基の三重変異、より好ましくは三重置換、が挙げられ、特に好ましくは、165番のアミノ酸残基のフェニルアラニンへの置

換と、300番のアミノ酸残基のバリンへの置換と、および313番のアミノ酸残基のリジンへの置換とからなる三重置換が挙げられる。

【0033】

本発明の第二の態様による変異体において、配列番号2に記載のアミノ酸配列およびその相同体の40番、379番、および381番のアミノ酸残基に導入される置換は、好ましくは、下記の通りである。

【0034】

40番のアミノ酸残基の、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群から選択される酸性アミノ酸、特にアスパラギン酸、への置換。

【0035】

379番のアミノ酸残基の、システインへの置換。

【0036】

381番のアミノ酸残基の、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、およびバリンからなる群から選択されるアミノ酸、特にメチオニン、への置換。

【0037】

本発明による第一および第二の態様による変異体において、「相同体」とは、1個または複数個の変異を有する配列番号2に記載のアミノ酸配列であって、 β -フルクトフラノシダーゼ活性を有するもの、を意味する。変異の数は、1個ないし数個、あるいは1、2、3、または4個であることができる。

【0038】

本発明において、相同体が β -フルクトフラノシダーゼ活性を有するか否かは、例えば、そのアミノ酸配列からなるタンパク質を基質に作用させ、反応産物を検出することにより評価することができ、例えば、実施例2に記載の方法に従って評価することができる。

【0039】

相同体における本発明による特定変異の位置は、配列番号2のアミノ酸配列と当該相同体とを整列することにより、相同体に与えられた配列番号2のアミノ酸残基番号に対応する。例えば、相同体における「62番のアミノ酸残基の変異」とは、その相同体の62番目のアミノ酸残基の変異ではなく、配列番号2のアミノ酸配列の62番のアミノ酸残基に対応する相同体のアミノ酸残基の変異を意味する。

【0040】

配列番号2のアミノ酸配列と当該相同体との整列は、配列同一性を調べるための分析用ソフトウェアを用いて行うことができる。このようなソフトウェアは周知であり、当業者であれば適宜選択して使用することができることは言うまでもない。例えば、BLAST法(Basic local alignment search tool; Altschul, S.F. et al., J.Mol.Biol., 215, 403-410(1990))を使用して配列番号2のアミノ酸配列と当該相同体とを整列させて、対応するアミノ酸残基を決定することができる。

【0041】

相同体の例としては、1個または複数個(例えば、1個ないし数個)の活性に影響を与えない変異を有する配列番号2に記載のアミノ酸配列が挙げられる。

【0042】

ここで「活性に影響を与えない変異」の例としては、保存的置換が挙げられる。「保存的置換」とは、タンパク質の活性を実質的に改変しないように1若しくは複数個のアミノ酸残基を、別の化学的に類似したアミノ酸残基で置き換えることを意味する。例えば、ある疎水性残基を別の疎水性残基によって置換する場合、ある極性残基を同じ電荷を有する別の極性残基によって置換する場合などが挙げられる。このような置換を行うことができる機能的に類似のアミノ酸は、アミノ酸毎に当該技術分野において公知である。具体例を挙げると、非極性(疎水性)アミノ酸としては、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、プロリン、トリプトファン、フェニルアラニン、メチオニン等が挙げられる。極性(中性)アミノ酸としては、グリシン、セリン、スレオニン、チロシン、グルタミン、アスパラギン、システイン等が挙げられる。陽電荷をもつ(塩基性)アミノ酸としては、ア

ルギニン、ヒスチジン、リジン等が挙げられる。また、負電荷をもつ（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸等が挙げられる。

【0043】

「相同体」の例としては、Aspergillus属に属する微生物から生産される β -フルクトフラノシダーゼが挙げられ、例えば、Aspergillus niger由来の β -フルクトフラノシダーゼ、Scopulariopsis brevicaulis由来の β -フルクトフラノシダーゼ、Penicillium roquefortii由来の β -フルクトフラノシダーゼが挙げられる。Scopulariopsis brevicaulis由来の β -フルクトフラノシダーゼとしてはWO99/13059号公報の配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質（配列番号4）が挙げられる。また、Penicillium roquefortii由来の β -フルクトフラノシダーゼとしてはWO99/13059号公報の配列番号3のアミノ酸配列からなるタンパク質（配列番号6）が挙げられる。

【0044】

本発明によれば、本発明による β -フルクトフラノシダーゼ変異体をコードする遺伝子が提供される。

【0045】

一般に、タンパク質のアミノ酸配列が与えられれば、それをコードするDNA配列は、いわゆるコドン表を参照して容易に定まる。従って、本発明による特定変異が導入された配列番号1のアミノ酸配列およびその相同体、例えば、本発明による特定変異が導入された配列番号1、3、および5のアミノ酸配列、をコードする種々のDNA配列を適宜選択することが可能である。よって、本発明による特定変異が導入された β -フルクトフラノシダーゼ変異体をコードするDNA配列とは、本発明による特定アミノ酸変異に対応するDNA変異を有する β -フルクトフラノシダーゼ遺伝子のみならず、その縮重関係にあるコドンが使用されている以外は同一のDNA配列を有し、かつ β -フルクトフラノシダーゼ変異体をコードするDNA配列をも意味する。例えば、本発明による特定変異が導入された配列番号1、3、および5のアミノ酸配列をコードするDNA配列とは、後述する表3に記載の1以上の変異を有する配列番号1、3、および5のDNA配列のみならず、その縮重関係にあるコドンが使用されている以外は同一のDNA配列を有し、かつ β -フルクトフラノシダーゼ変異体をコードするDNA配列をも意味する。

【0046】

β -フルクトフラノシダーゼ変異体の作製

β -フルクトフラノシダーゼ変異体は、組換えDNA技術、ポリペプチド合成技術などによって作製することができる。組換えDNA技術を用いる場合には、 β -フルクトフラノシダーゼをコードするDNA（例えば、配列番号1、3、または5のDNA配列）を取得し、このDNAに部位特異的変異あるいはランダム変異を発生させてコードするアミノ酸を置換させた後、変異処理を施したDNAを含む発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、形質転換細胞を培養することによって β -フルクトフラノシダーゼ変異体を調製することができる。

【0047】

遺伝子の部位特異的変異を導入するための方法は、Gapped duplex法やKunkel法など当業者に周知の方法を用いることができる。これらの方法は、 β -フルクトフラノシダーゼをコードするDNAの特異的部位に突然変異を発生させることに利用することができる。

【0048】

また、ランダム変異を導入するためには、エラープローンPCR法など一般的に行われている方法が採用できる。変異処理後のDNAの塩基配列は、マキサム・ギルバートの化学修飾法やジデオキシヌクレオチド鎖終結法などにより確認することができ、 β -フルクトフラノシダーゼ変異体のアミノ酸配列は、確認された塩基配列より解読することができる。

【0049】

β -フルクトフラノシダーゼ変異体の生産

β -フルクトフラノシダーゼ変異体は、それをコードするDNA断片を、宿主細胞内で

複製可能でかつ同遺伝子が発現可能な状態で含むDNA分子、特にDNA発現ベクター、に連結してなる組換えベクターを調製し、その組換えベクターを宿主に導入して形質転換体を得、その形質転換体を適当な培養条件下で培養することにより、調製することができる。

【0050】

本発明において利用されるベクターは、使用する宿主細胞の種類を勘案して、ウィルス、プラスミド、コスミドベクターなどから適宜選択することができる。例えば、宿主細胞が大腸菌の場合はpUC、pBR系のプラスミド、枯草菌の場合はpUB系のプラスミド、酵母の場合はYEp、YRp、YCp系のプラスミドベクターが挙げられる。

【0051】

本発明の好ましい態様によれば、組換えベクターとしてプラスミドを使用することができる。プラスミドは形質転換体の選択マーカを含むのが好ましく、選択マーカとしては薬剤耐性マーカ、栄養要求マーカ遺伝子を使用することができる。その好ましい具体例としては、使用する宿主細胞が細菌の場合はアンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子などであり、酵母の場合はトリプトファン合成遺伝子（TRP1）、ウラシル合成遺伝子（URA3）、ロイシン合成遺伝子（LEU2）などがあり、カビの場合はハイグロマイシン耐性遺伝子（Hyg）、ビアラホス耐性遺伝子（Bar）、硝酸還元酵素遺伝子（niaD）などが挙げられる。

【0052】

本発明による発現ベクターとしてのDNA分子は、変異遺伝子の発現に必要なDNA配列、例えばプロモーター、転写開始信号、リボゾーム結合部位、翻訳停止シグナル、転写終結シグナルなどの転写調節シグナル、翻訳調節シグナルなどを有しているのが好ましい。

【0053】

プロモーターとしては、挿入断片に含まれる宿主中において機能することができるプロモーターはもちろんのこと、大腸菌においてはラクトースオペロン（lac）、トリプトファンオペロン（trp）等のプロモーター、酵母ではアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子（ADH）、酸性フォスファターゼ遺伝子（PHO）、ガラクトース遺伝子（GAL）、グリセロアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（GPD）などのプロモーター、カビでは α -アミラーゼ遺伝子（amy）、セロビオハイドロラーゼI遺伝子（CBHI）等のプロモーターを好ましく用いることができる。

【0054】

宿主としては、宿主ベクター系が確立されているものであればいずれも利用可能であり、好ましくは、カビ、酵母が挙げられる。宿主細胞の形質転換により得られた形質転換体は、適当な条件で培養し、得られた培養液から一般的な方法によって酵素の分取や精製を行うことにより β -フルクトフラノシダーゼ変異体を得ることができる。また、宿主が枯草菌、酵母、カビの場合には、分泌型ベクターを使用して、菌体外に組換え β -フルクトフラノシダーゼを分泌させることも有利である。

【0055】

形質転換体から生産される本発明による変異体は、次のようにして得ることが出来る。まず前記の宿主細胞を適切な条件下で培養し、得られた培養物から公知の方法、例えば遠心分離により培養上清あるいは菌体を得る。菌体の場合にはこれを適切な緩衝液中に懸濁し、凍結融解、超音波処理、磨砕等により菌体を破碎し、遠心分離またはろ過により組換え新規酵素を含有する菌体抽出物を得る。

【0056】

酵素の精製は、慣用されている分離、精製法を適宜組み合わせて実施することができる。例えば、熱処理のような耐熱性の差を利用する方法、塩沈殿および溶媒沈殿のような溶解性の差を利用する方法、透析、限外ろ過、ゲルろ過およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のような分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーのよう

な電荷の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーのような特異的親和性を利用する方法、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーのような疎水性の差を利用する方法、更に等電点電気泳動のような等電点の差を利用する方法等が挙げられる。

【0057】

フラクトオリゴ糖の製造

本発明によれば、本発明による形質転換体または本発明による β -フルクトフラノシダーゼ変異体を用いた、フラクトオリゴ糖の製造法が提供される。すなわち、本発明によるフラクトオリゴ糖の製造法は、本発明による形質転換体または本発明による β -フルクトフラノシダーゼ変異体と、スクロースとを接触させることによって実施される。

【0058】

本発明による形質転換体または本発明による β -フルクトフラノシダーゼ変異体と、スクロースとの接触態様およびその条件は、変異体がスクロースに作用可能な様態である限り特に限定されない。溶液中で接触させる場合の好ましい態様を示せば次の通りである。すなわち、スクロースの使用濃度は、用いる糖が溶解されうる範囲であれば、本酵素の比活性、反応温度等を考慮して適宜選択してよいが、5～80%の範囲とするのが一般的であり、好ましくは30～70%の範囲である。糖と酵素との反応における反応温度およびpH条件は、変異体の最適条件下で行うことが好ましく、例えば、30～80℃程度、pH4～10程度の条件下で行うのが一般的であり、好ましくは40～70℃、pH5～7の範囲である。

【0059】

また、変異体の精製の程度も適宜選択することができ、形質転換体の培養上清あるいは菌体破砕物から粗酵素のまま用いることもでき、また、各種精製工程で得られた精製酵素として利用してもよい。さらには各種精製手段を経て単離精製された酵素として用いてもよい。

【0060】

更に酵素は、常法に準じて担体に固定化された状態でスクロースと接触させてもよい。

【0061】

生成したフラクトオリゴ糖は、反応液を公知の方法に従い精製することにより得ることが出来る。例えば、加熱して酵素を失活させた後、活性炭により脱色し、さらに、イオン交換樹脂で脱塩する方法が挙げられる。

【0062】

本発明の第一の態様の変異体をフラクトオリゴ糖の調製に用いると、1-kestose生成量が増大し、nystose生成量が抑制される。従って、本発明によれば1-kestoseの選択的な製造法が提供される。すなわち本発明によれば、第一の態様の β -フルクトフラノシダーゼ変異体あるいは第一の態様の β -フルクトフラノシダーゼ変異体をコードするポリヌクレオチドを発現可能な形質転換体と、スクロースを接触させる工程を含んでなる、1-kestoseの製造法が提供される。

【0063】

本発明の第二の態様の変異体をフラクトオリゴ糖の調製に用いると、nystoseの生成量が増大し、1-kestose生成量が抑制される。従って、本発明によればnystoseの選択的な製造法が提供される。すなわち本発明によれば、第二の態様の β -フルクトフラノシダーゼ変異体あるいは第二の態様の β -フルクトフラノシダーゼ変異体をコードするポリヌクレオチドを発現可能な形質転換体と、スクロースを接触させる工程を含んでなる、nystoseの製造法が提供される。

【実施例】

【0064】

本発明を下記例により詳細に説明するが、本発明がこれらの例に限定されないことは言うまでもない。

【0065】

実施例1： β -フルクトフラノシダーゼ変異体の作製

β -フルクトフラノシダーゼ遺伝子へのランダム変異の導入は、市販のPCR mutagenesis kit (Gene Morph, Stratagene社)を用いて以下のように行った。鋳型DNAとして、ATCC 20611株 (*A. niger*) 由来の β -フルクトフラノシダーゼ遺伝子を用いた。具体的には、WO 97/34004に記載のプラスミド pAW20-Hyg を使用した。PCR反応液は、鋳型DNA 1 μ l、40mM dNTP 1 μ l、10倍濃度の緩衝液5 μ l、プライマーとして5'-GCGAATTCATGAAGCTCACCACTACCA-3' (N末) (配列番号7) および5'-GCGGATCCCGGTCAATTCTCT-3' (C末) (配列番号8) 250 ng/mlを各0.5 μ l、Mutazyme 1 μ l、DMSO 5 μ l、滅菌水36 μ lを加えて50 μ lとした。反応は94℃、2分間の前処理後、94℃、1分間 (変性ステップ)、50℃、2分間 (アニーリングステップ)、72℃、2.5分間 (伸長ステップ) のインキュベーションを30サイクル行った。最後に72℃、3分間のインキュベーションを行い反応を終了させた。反応液をフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコールで抽出し、その後エタノール沈殿を行った。沈殿をTE緩衝液に溶解後、アガロース電気泳動を行い、特異的に増幅された1.9 kbpのバンドを常法に従って切り出してDNA断片を回収した。WO 97/34004に記載の方法で、1.9 kbpのEcoRI-BamHI断片をpY2831のEcoRI-BamHI部位に挿入したプラスミドを*S. cerevisiae* MS-161株に酢酸リチウム法で導入し、形質転換体を得た。得られた形質転換体をSD-GF培地 (0.67% yeast nitrogen base w/o amino acids、2% スクロース、2% casamino acids、50 μ g/ml ウラシル) で30℃、3日間培養し、 β -フルクトフラノシダーゼ変異体を得た。

【0066】

実施例2： β -フルクトフラノシダーゼ変異体の反応特性の評価

実施例1で作製した β -フルクトフラノシダーゼ変異体を用いてスクロースを基質とした酵素反応を基質濃度48%、pH7、40℃の反応条件で行い、反応液の糖組成をHPLC分析した。野生型 β -フルクトフラノシダーゼの酵素反応液の糖組成と比較して、糖組成が変動したものを反応特性が改変された β -フルクトフラノシダーゼ変異体とした。

【0067】

反応特性が改変された β -フルクトフラノシダーゼ変異体の変異点を同定するために、DNA塩基配列を解析した。ファルマシア社のDNAシーケンスキットを用い、シーケンス反応を行った。反応後のサンプルは、ファルマシア社のDNAシーケンサー (ALFred) を用いて解析を行い、各DNA断片の塩基配列を得た。その後、DNA解析ソフト (DNASIS、日立ソフトウェアエンジニアリング社) にて最終的な塩基配列を得て、ランダム変異の導入された変異点を決定した。その結果、表1および表2に示したように、1-kestose生成量が増大し、nystose生成量が抑制される β -フルクトフラノシダーゼ変異体、およびnystose生成量が増大した β -フルクトフラノシダーゼ変異体が見られていることが明らかとなった。

【表 1】

表 1 : 1-ケストース生成量が増大し、ニストース生成量が抑制されたβ-フルクトフラノシダーゼ変異体

	F	G	G F	G F ₂	G F ₃	G F ₄
野生型	0.4	22.3	20.5	45.1	11.3	0.3
G 6 2 E	0.6	22.1	21.1	46.0	10.0	0.2
L 1 2 2 M	0.7	22.1	19.7	47.9	9.6	0.0
I 1 2 8 N	0.8	20.7	26.5	45.1	6.5	0.5
V 1 6 5 F	0.6	22.0	19.8	46.8	10.8	0.0
H 2 2 1 Y	0.6	23.8	20.1	45.8	9.5	0.2
Q 3 9 5 L	0.6	22.1	21.4	46.5	9.1	0.2
T 5 5 0 S	0.9	26.3	13.1	48.4	10.4	0.9

F : フルクトース

G : グルコース

G F : スクロース

G F 2 : 1-ケストース

G F 3 : ニストース

G F 4 : 1-フルクトシルニストース

【表 2】

表 2 : ニストースの生成量が増大し、1-ケストース生成量が

抑制された β -フルクトフラノシダーゼ変異体

	F	G	G F	G F ₂	G F ₃	G F ₄
野生型	0.4	22.3	20.5	45.1	11.3	0.3
G 4 0 D	0.6	22.3	20.3	41.6	14.7	0.5
T 3 8 1 M	1.5	23.7	23.9	28.8	19.3	2.8
W 3 7 9 C	1.1	22.6	22.5	36.2	17.0	0.6

F : フルクトース

G : グルコース

G F : スクロース

G F 2 : 1-ケストース

G F 3 : ニストース

G F 4 : 1-フルクトシルニストース

【 0 0 6 8 】

得られた変異とそれに対応する D N A 配列は下記の通りであった。下線は変異した D N A を示す。

【表 3】

表 3：変異部分のアミノ酸残基と DNA 配列

G 6 2 E	G A C	G <u>A</u> G	G A C	
	A s p	G l u	A s p	(配列番号 9)
L 1 2 2 M	T T C	<u>A</u> T G	C C C	
	P h e	M e t	P r o	(配列番号 1 0)
I 1 2 8 N	T C C	A <u>A</u> C	C C C	
	S e r	A s n	P r o	(配列番号 1 1)
V 1 6 5 F	G C C	<u>T</u> T C	G A C	
	A l a	P h e	A s p	(配列番号 1 2)
H 2 2 1 Y	G T G	<u>T</u> A C	G G C	
	V a l	T y r	G l y	(配列番号 1 3)
Q 3 9 5 L	G C C	C <u>T</u> G	C A G	
	A l a	L e u	G l n	(配列番号 1 4)
T 5 5 0 S	T T T	<u>T</u> C <u>G</u>	G A G	
	P h e	S e r	G l u	(配列番号 1 5)
G 4 0 D	A T C	G <u>A</u> C	G A C	
	I l e	A s p	A s p	(配列番号 1 6)
T 3 8 1 M	T T G	A <u>T</u> G	G G C	
	L e u	M e t	G l y	(配列番号 1 7)
W 3 7 9 C	G T C	T G <u>C</u>	T T G	
	V a l	C y s	L e u	(配列番号 1 8)

【0 0 6 9】

実施例 3：部位指定変異による多重置換体の調製と反応特性の評価

実施例 2 で得られた V 1 6 5 F と W O 9 7 / 3 4 0 0 4 に記載の G 3 0 0 V と H 3 1 3 K を組み合わせた 3 重置換変異体を部位特異的変異導入により調製した。具体的には、実施例 1 および 2 で調製した V 1 6 5 F の変異が導入された β -フルクトフラノシダーゼ遺伝子を p U C 1 1 8 (宝酒造) の E c o R I - B a m H I 部位に挿入したプラスミドを調製した。次いで、W O 9 7 / 3 4 0 0 4 号公報の実施例 D 8 と同様の方法で G 3 0 0 V と H 3 1 3 K の変異を順次導入した。実施例 2 と同じ方法で DNA 塩基配列を調べた結果、目的の部分の塩基配列のみが置換されていることを確認した。

【 0 0 7 0 】

3 重置換体 V 1 6 5 F + G 3 0 0 V + H 3 1 3 K の反応特性を実施例 2 の方法に従って調べた結果は表 3 に記載される通りであった。野生型 β -フルクトフラノシダーゼと比較すると、1 -ケストースの糖組成% は約 1 0 % 増大し、ニストースの生成量は 7 % 減少した。

【表 4】

表 4 : 三重置換体の反応特性

	F	G	G F	G F ₂	G F ₃	G F ₄
野生型	0.4	22.3	20.5	45.1	11.3	0.3
V165F/G300V/H313K	1.7	22.5	15.8	55.7	4.3	0.0

F : フルクトース

G : グルコース

G F : スクロース

G F 2 : 1 -ケストース

G F 3 : ニストース

G F 4 : 1 -フルクトシルニストース

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Meiji Seika Kaisya Ltd.

<120> Mutated β -fructofranosidase

<130> 146856

<140>

<141>

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1905

<212> DNA

<213> Aspergillus niger

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1905)

<400> 1

tca	tac	cac	ctg	gac	acc	acg	gcc	ccg	ccg	ccg	acc	aac	ctc	agc	acc	48
Ser	Tyr	His	Leu	Asp	Thr	Thr	Ala	Pro	Pro	Pro	Thr	Asn	Leu	Ser	Thr	
1				5				10					15			

ctc	ccc	aac	aac	acc	ctc	ttc	cac	gtg	tgg	cgg	ccg	cgc	gcg	cac	atc	96
Leu	Pro	Asn	Asn	Thr	Leu	Phe	His	Val	Trp	Arg	Pro	Arg	Ala	His	Ile	
			20					25					30			

ctg	ccc	gcc	gag	ggc	cag	atc	ggc	gac	ccc	tgc	gcg	cac	tac	acc	gac	144
Leu	Pro	Ala	Glu	Gly	Gln	Ile	Gly	Asp	Pro	Cys	Ala	His	Tyr	Thr	Asp	
		35					40					45				

cca	tcc	acc	ggc	ctc	ttc	cac	gtg	ggg	ttc	ctg	cac	gac	ggg	gac	ggc	192
Pro	Ser	Thr	Gly	Leu	Phe	His	Val	Gly	Phe	Leu	His	Asp	Gly	Asp	Gly	
	50					55					60					

atc	gcg	ggc	gcc	acc	acg	gcc	aac	ctg	gcc	acc	tac	acc	gat	acc	tcc	240
Ile	Ala	Gly	Ala	Thr	Thr	Ala	Asn	Leu	Ala	Thr	Tyr	Thr	Asp	Thr	Ser	
65					70				75						80	

gat	aac	ggg	agc	ttc	ctg	atc	cag	ccg	ggc	ggg	aag	aac	gac	ccc	gtc	288
Asp	Asn	Gly	Ser	Phe	Leu	Ile	Gln	Pro	Gly	Gly	Lys	Asn	Asp	Pro	Val	
				85					90						95	

g c c	g t g	t t c	g a c	g g c	g c c	g t c	a t c	c c c	g t c	g g c	g t c	a a c	a a c	a c c	c c c	3 3 6
Ala	Val	Phe	Asp	Gly	Ala	Val	Ile	Pro	Val	Gly	Val	Asn	Asn	Thr	Pro	
			100					105					110			
a c c	t t a	c t c	t a c	a c c	t c c	g t c	t c c	t t c	c t g	c c c	a t c	c a c	t g g	t c c	a t c	3 8 4
Thr	Leu	Leu	Tyr	Thr	Ser	Val	Ser	Phe	Leu	Pro	Ile	His	Trp	Ser	Ile	
		115					120					125				
c c c	t a c	a c c	c g c	g g c	a g c	g a g	a c g	c a g	t c g	t t g	g c c	g t c	g c g	c g c	g a c	4 3 2
Pro	Tyr	Thr	Arg	Gly	Ser	Glu	Thr	Gln	Ser	Leu	Ala	Val	Ala	Arg	Asp	
	130					135					140					
g g c	g g c	c g c	c g c	t t c	g a c	a a g	c t c	g a c	c a g	g g c	c c c	g t c	a t c	g c c	g a c	4 8 0
Gly	Gly	Arg	Arg	Phe	Asp	Lys	Leu	Asp	Gln	Gly	Pro	Val	Ile	Ala	Asp	
145					150					155					160	
c a c	c c c	t t c	g c c	g t c	g a c	g t c	a c c	g c c	t t c	c g c	g a t	c c g	t t t	g t c	t t c	5 2 8
His	Pro	Phe	Ala	Val	Asp	Val	Thr	Ala	Phe	Arg	Asp	Pro	Phe	Val	Phe	
				165					170					175		
c g c	a g t	g c c	a a g	t t g	g a t	g t g	c t g	c t g	t c g	t t g	g a t	g a g	g a g	g t g	g c g	5 7 6
Arg	Ser	Ala	Lys	Leu	Asp	Val	Leu	Leu	Ser	Leu	Asp	Glu	Glu	Val	Ala	
		180					185						190			
c g g	a a t	g a g	a c g	g c c	g t g	c a g	c a g	g c c	g t c	g a t	g g c	t g g	a c c	g a g	a a g	6 2 4
Arg	Asn	Glu	Thr	Ala	Val	Gln	Gln	Ala	Val	Asp	Gly	Trp	Thr	Glu	Lys	
		195					200					205				
a a c	g c c	c c c	t g g	t a t	g t c	g c g	g t c	t c t	g g c	g g g	g t g	c a c	g g c	g t c	g g g	6 7 2
Asn	Ala	Pro	Trp	Tyr	Val	Ala	Val	Ser	Gly	Gly	Val	His	Gly	Val	Gly	
	210					215					220					
c c c	g c g	c a g	t t c	c t c	t a c	c g c	c a g	a a c	g g c	g g g	a a c	g c t	t c c	g a g	t t c	7 2 0
Pro	Ala	Gln	Phe	Leu	Tyr	Arg	Gln	Asn	Gly	Gly	Asn	Ala	Ser	Glu	Phe	
225					230					235					240	
c a g	t a c	t g g	g a g	t a c	c t c	g g g	g a g	t g g	t g g	c a g	g a g	g c g	a c c	a a c	t c c	7 6 8
Gln	Tyr	Trp	Glu	Tyr	Leu	Gly	Glu	Trp	Trp	Gln	Glu	Ala	Thr	Asn	Ser	
			245					250						255		
a g c	t g g	g g c	g a c	g a g	g g c	a c c	t g g	g c c	g g g	c g c	t g g	g g g	t t c	a a c	t t c	8 1 6
Ser	Trp	Gly	Asp	Glu	Gly	Thr	Trp	Ala	Gly	Arg	Trp	Gly	Phe	Asn	Phe	
			260					265					270			
g a g	a c g	g g g	a a t	g t g	c t c	t t c	c t c	a c c	g a g	g a g	g g c	c a t	g a c	c c c	c a g	8 6 4
Glu	Thr	Gly	Asn	Val	Leu	Phe	Leu	Thr	Glu	Glu	Gly	His	Asp	Pro	Gln	
		275					280					285				
a c g	g g c	g a g	g t g	t t c	g t c	a c c	c t c	g g c	a c g	g a g	g g g	t c t	g g c	c t g	c c a	9 1 2
Thr	Gly	Glu	Val	Phe	Val	Thr	Leu	Gly	Thr	Glu	Gly	Ser	Gly	Leu	Pro	

290						295						300						
atc	gtg	ccg	cag	gtc	tcc	agt	atc	cac	gat	atg	ctg	tgg	gcg	gcg	ggt			960
Ile	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Ser	Ile	His	Asp	Met	Leu	Trp	Ala	Ala	Gly			
305					310					315					320			
gag	gtc	ggg	gtg	ggc	agt	gag	cag	gag	ggt	gcc	aag	gtc	gag	ttc	tcc			1008
Glu	Val	Gly	Val	Gly	Ser	Glu	Gln	Glu	Gly	Ala	Lys	Val	Glu	Phe	Ser			
				325					330					335				
ccc	tcc	atg	gcc	ggg	ttt	ctg	gac	tgg	ggg	ttc	agc	gcc	tac	gct	gcg			1056
Pro	Ser	Met	Ala	Gly	Phe	Leu	Asp	Trp	Gly	Phe	Ser	Ala	Tyr	Ala	Ala			
			340					345					350					
gcg	ggc	aag	gtg	ctg	ccg	gcc	agc	tcg	gcg	gtg	tcg	aag	acc	agc	ggc			1104
Ala	Gly	Lys	Val	Leu	Pro	Ala	Ser	Ser	Ala	Val	Ser	Lys	Thr	Ser	Gly			
		355					360					365						
gtg	gag	gtg	gat	cgg	tat	gtc	tcg	ttc	gtc	tgg	ttg	acg	ggc	gac	cag			1152
Val	Glu	Val	Asp	Arg	Tyr	Val	Ser	Phe	Val	Trp	Leu	Thr	Gly	Asp	Gln			
	370					375					380							
tac	gag	cag	gcg	gac	ggg	ttc	ccc	acg	gcc	cag	cag	ggg	tgg	acg	ggg			1200
Tyr	Glu	Gln	Ala	Asp	Gly	Phe	Pro	Thr	Ala	Gln	Gln	Gly	Trp	Thr	Gly			
385					390					395					400			
tcg	ctg	ctg	ctg	ccg	cgc	gag	ctg	aag	gtg	cag	acg	gtg	gag	aac	gtc			1248
Ser	Leu	Leu	Leu	Pro	Arg	Glu	Leu	Lys	Val	Gln	Thr	Val	Glu	Asn	Val			
				405					410					415				
gtc	gac	aac	gag	ctg	gtg	cgc	gag	gag	ggc	gtg	tcg	tgg	gtg	gtg	ggg			1296
Val	Asp	Asn	Glu	Leu	Val	Arg	Glu	Glu	Gly	Val	Ser	Trp	Val	Val	Gly			
			420					425				430						
gag	tcg	gac	aac	cag	acg	gcc	agg	ctg	cgc	acg	ctg	ggg	atc	acg	atc			1344
Glu	Ser	Asp	Asn	Gln	Thr	Ala	Arg	Leu	Arg	Thr	Leu	Gly	Ile	Thr	Ile			
		435					440					445						
gcc	cgg	gag	acc	aag	gcg	gcc	ctg	ctg	gcc	aac	ggc	tcg	gtg	acc	gcg			1392
Ala	Arg	Glu	Thr	Lys	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Asn	Gly	Ser	Val	Thr	Ala			
	450					455					460							
gag	gag	gac	cgc	acg	ctg	cag	acg	gcg	gcc	gtc	gtg	ccg	ttc	gcg	caa			1440
Glu	Glu	Asp	Arg	Thr	Leu	Gln	Thr	Ala	Ala	Val	Val	Pro	Phe	Ala	Gln			
465					470				475						480			
tcg	ccg	agc	tcc	aag	ttc	ttc	gtg	ctg	acg	gcc	cag	ctg	gag	ttc	ccc			1488
Ser	Pro	Ser	Ser	Lys	Phe	Phe	Val	Leu	Thr	Ala	Gln	Leu	Glu	Phe	Pro			
				485					490					495				

g c g	a g c	g c g	c g c	t c g	t c c	c c g	c t c	c a g	t c c	g g g	t t c	g a a	a t c	c t g	g c g	1 5 3 6
Ala	Ser	Ala	Arg	Ser	Ser	Pro	Leu	Gln	Ser	Gly	Phe	Glu	Ile	Leu	Ala	
			5 0 0					5 0 5					5 1 0			
t c g	g a g	c t g	g a g	c g c	a c g	g c c	a t c	t a c	t a c	c a g	t t c	a g c	a a c	g a g	t c g	1 5 8 4
Ser	Glu	Leu	Glu	Arg	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Gln	Phe	Ser	Asn	Glu	Ser	
		5 1 5					5 2 0					5 2 5				
c t g	g t c	g t c	g a c	c g c	a g c	c a g	a c t	a g t	g c g	g c g	g c g	c c c	a c g	a a c	c c c	1 6 3 2
Leu	Val	Val	Asp	Arg	Ser	Gln	Thr	Ser	Ala	Ala	Ala	Pro	Thr	Asn	Pro	
	5 3 0					5 3 5					5 4 0					
g g g	c t g	g a t	a g c	t t t	a c t	g a g	t c c	g g c	a a g	t t g	c g g	t t g	t t c	g a c	g t g	1 6 8 0
Gly	Leu	Asp	Ser	Phe	Thr	Glu	Ser	Gly	Lys	Leu	Arg	Leu	Phe	Asp	Val	
5 4 5					5 5 0					5 5 5					5 6 0	
a t c	g a g	a a c	g g c	c a g	g a g	c a g	g t c	g a g	a c g	t t g	g a t	c t c	a c t	g t c	g t c	1 7 2 8
Ile	Glu	Asn	Gly	Gln	Glu	Gln	Val	Glu	Thr	Leu	Asp	Leu	Thr	Val	Val	
			5 6 5						5 7 0					5 7 5		
g t g	g a t	a a c	g c g	g t t	g t c	g a g	g t g	t a t	g c c	a a c	g g g	c g c	t t t	g c g	t t g	1 7 7 6
Val	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Glu	Val	Tyr	Ala	Asn	Gly	Arg	Phe	Ala	Leu	
			5 8 0					5 8 5					5 9 0			
a g c	a c c	t g g	g c g	a g a	t c g	t g g	t a c	g a c	a a c	t c c	a c c	c a g	a t c	c g c	t t c	1 8 2 4
Ser	Thr	Trp	Ala	Arg	Ser	Trp	Tyr	Asp	Asn	Ser	Thr	Gln	Ile	Arg	Phe	
		5 9 5					6 0 0					6 0 5				
t t c	c a c	a a c	g g c	g a g	g g c	g a g	g t g	c a g	t t c	a g g	a a t	g t c	t c c	g t g	t c g	1 8 7 2
Phe	His	Asn	Gly	Glu	Gly	Glu	Val	Gln	Phe	Arg	Asn	Val	Ser	Val	Ser	
	6 1 0					6 1 5					6 2 0					
g a g	g g g	c t c	t a t	a a c	g c c	t g g	c c g	g a g	a g a	a a t						1 9 0 5
Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Ala	Trp	Pro	Glu	Arg	Asn						
6 2 5					6 3 0					6 3 5						

<210> 2
<211> 635
<212> PRT
<213> Aspergillus niger

<400> 2
Ser Tyr His Leu Asp Thr Thr Ala Pro Pro Pro Thr Asn Leu Ser Thr
1 5 10 15
Leu Pro Asn Asn Thr Leu Phe His Val Trp Arg Pro Arg Ala His Ile
20 25 30
Leu Pro Ala Glu Gly Gln Ile Gly Asp Pro Cys Ala His Tyr Thr Asp

		35					40					45				
Pro	Ser	Thr	Gly	Leu	Phe	His	Val	Gly	Phe	Leu	His	Asp	Gly	Asp	Gly	
	50					55					60					
Ile	Ala	Gly	Ala	Thr	Thr	Ala	Asn	Leu	Ala	Thr	Tyr	Thr	Asp	Thr	Ser	
65					70					75					80	
Asp	Asn	Gly	Ser	Phe	Leu	Ile	Gln	Pro	Gly	Gly	Lys	Asn	Asp	Pro	Val	
				85					90					95		
Ala	Val	Phe	Asp	Gly	Ala	Val	Ile	Pro	Val	Gly	Val	Asn	Asn	Thr	Pro	
			100					105					110			
Thr	Leu	Leu	Tyr	Thr	Ser	Val	Ser	Phe	Leu	Pro	Ile	His	Trp	Ser	Ile	
		115					120					125				
Pro	Tyr	Thr	Arg	Gly	Ser	Glu	Thr	Gln	Ser	Leu	Ala	Val	Ala	Arg	Asp	
	130					135					140					
Gly	Gly	Arg	Arg	Phe	Asp	Lys	Leu	Asp	Gln	Gly	Pro	Val	Ile	Ala	Asp	
145					150					155					160	
His	Pro	Phe	Ala	Val	Asp	Val	Thr	Ala	Phe	Arg	Asp	Pro	Phe	Val	Phe	
				165					170					175		
Arg	Ser	Ala	Lys	Leu	Asp	Val	Leu	Leu	Ser	Leu	Asp	Glu	Glu	Val	Ala	
			180					185						190		
Arg	Asn	Glu	Thr	Ala	Val	Gln	Gln	Ala	Val	Asp	Gly	Trp	Thr	Glu	Lys	
		195					200					205				
Asn	Ala	Pro	Trp	Tyr	Val	Ala	Val	Ser	Gly	Gly	Val	His	Gly	Val	Gly	
	210					215					220					
Pro	Ala	Gln	Phe	Leu	Tyr	Arg	Gln	Asn	Gly	Gly	Asn	Ala	Ser	Glu	Phe	
225					230					235					240	
Gln	Tyr	Trp	Glu	Tyr	Leu	Gly	Glu	Trp	Trp	Gln	Glu	Ala	Thr	Asn	Ser	
			245						250					255		
Ser	Trp	Gly	Asp	Glu	Gly	Thr	Trp	Ala	Gly	Arg	Trp	Gly	Phe	Asn	Phe	
			260					265					270			
Glu	Thr	Gly	Asn	Val	Leu	Phe	Leu	Thr	Glu	Glu	Gly	His	Asp	Pro	Gln	
		275					280					285				
Thr	Gly	Glu	Val	Phe	Val	Thr	Leu	Gly	Thr	Glu	Gly	Ser	Gly	Leu	Pro	
	290					295					300					

I l e	V a l	P r o	G l n	V a l	S e r	S e r	I l e	H i s	A s p	M e t	L e u	T r p	A l a	A l a	G l y	
305					310					315					320	
G l u	V a l	G l y	V a l	G l y	S e r	G l u	G l n	G l u	G l y	A l a	L y s	V a l	G l u	P h e	S e r	
				325					330					335		
P r o	S e r	M e t	A l a	G l y	P h e	L e u	A s p	T r p	G l y	P h e	S e r	A l a	T y r	A l a	A l a	
			340					345					350			
A l a	G l y	L y s	V a l	L e u	P r o	A l a	S e r	S e r	A l a	V a l	S e r	L y s	T h r	S e r	G l y	
		355					360					365				
V a l	G l u	V a l	A s p	A r g	T y r	V a l	S e r	P h e	V a l	T r p	L e u	T h r	G l y	A s p	G l n	
	370					375					380					
T y r	G l u	G l n	A l a	A s p	G l y	P h e	P r o	T h r	A l a	G l n	G l n	G l y	T r p	T h r	G l y	
385					390					395					400	
S e r	L e u	L e u	L e u	P r o	A r g	G l u	L e u	L y s	V a l	G l n	T h r	V a l	G l u	A s n	V a l	
				405					410					415		
V a l	A s p	A s n	G l u	L e u	V a l	A r g	G l u	G l u	G l y	V a l	S e r	T r p	V a l	V a l	G l y	
			420					425					430			
G l u	S e r	A s p	A s n	G l n	T h r	A l a	A r g	L e u	A r g	T h r	L e u	G l y	I l e	T h r	I l e	
		435					440					445				
A l a	A r g	G l u	T h r	L y s	A l a	A l a	L e u	L e u	A l a	A s n	G l y	S e r	V a l	T h r	A l a	
	450					455					460					
G l u	G l u	A s p	A r g	T h r	L e u	G l n	T h r	A l a	A l a	V a l	V a l	P r o	P h e	A l a	G l n	
465					470					475					480	
S e r	P r o	S e r	S e r	L y s	P h e	P h e	V a l	L e u	T h r	A l a	G l n	L e u	G l u	P h e	P r o	
				485					490					495		
A l a	S e r	A l a	A r g	S e r	S e r	P r o	L e u	G l n	S e r	G l y	P h e	G l u	I l e	L e u	A l a	
			500					505					510			
S e r	G l u	L e u	G l u	A r g	T h r	A l a	I l e	T y r	T y r	G l n	P h e	S e r	A s n	G l u	S e r	
		515					520					525				
L e u	V a l	V a l	A s p	A r g	S e r	G l n	T h r	S e r	A l a	A l a	A l a	P r o	T h r	A s n	P r o	
	530					535					540					
G l y	L e u	A s p	S e r	P h e	T h r	G l u	S e r	G l y	L y s	L e u	A r g	L e u	P h e	A s p	V a l	
545					550					555					560	
I l e	G l u	A s n	G l y	G l n	G l u	G l n	V a l	G l u	T h r	L e u	A s p	L e u	T h r	V a l	V a l	
				565					570					575		

Val Asp Asn Ala Val Val Glu Val Tyr Ala Asn Gly Arg Phe Ala Leu
580 585 590

Ser Thr Trp Ala Arg Ser Trp Tyr Asp Asn Ser Thr Gln Ile Arg Phe
595 600 605

Phe His Asn Gly Glu Gly Glu Val Gln Phe Arg Asn Val Ser Val Ser
610 615 620

Glu Gly Leu Tyr Asn Ala Trp Pro Glu Arg Asn
625 630 635

<210> 3
<211> 1809
<212> DNA
<213> Penicillium roqueforti

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1809)

<400> 3

gtt	gat	ttc	cat	acc	ccg	att	gac	tat	aac	tcg	gct	ccg	cca	aac	ctt	48
Val	Asp	Phe	His	Thr	Pro	Ile	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ala	Pro	Pro	Asn	Leu	
1				5					10					15		

tct	acc	ctg	gca	aac	gca	tct	ctt	ttc	aag	aca	tgg	aga	ccc	aga	gcc	96
Ser	Thr	Leu	Ala	Asn	Ala	Ser	Leu	Phe	Lys	Thr	Trp	Arg	Pro	Arg	Ala	
			20					25					30			

cat	ctt	ctc	cct	cca	tct	ggg	aac	ata	ggc	gac	ccg	tgc	ggg	cac	tat	144
His	Leu	Leu	Pro	Pro	Ser	Gly	Asn	Ile	Gly	Asp	Pro	Cys	Gly	His	Tyr	
		35					40					45				

acc	gat	ccc	aag	act	ggg	ctc	ttc	cac	gtg	ggg	tgg	ctt	tac	agt	ggg	192
Thr	Asp	Pro	Lys	Thr	Gly	Leu	Phe	His	Val	Gly	Trp	Leu	Tyr	Ser	Gly	
	50					55					60					

att	tcg	gga	gcg	aca	acc	gac	gat	ctc	gtt	acc	tat	aaa	gac	ctc	aat	240
Ile	Ser	Gly	Ala	Thr	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Thr	Tyr	Lys	Asp	Leu	Asn	
65					70					75					80	

ccc	gat	gga	gcc	ccg	tca	att	gtt	gca	gga	gga	aag	aac	gac	cct	ctt	288
Pro	Asp	Gly	Ala	Pro	Ser	Ile	Val	Ala	Gly	Gly	Lys	Asn	Asp	Pro	Leu	
				85					90						95	

tct	gtc	ttc	gat	ggc	tcg	gtc	att	cca	agc	ggg	ata	gac	ggc	atg	cca	336
Ser	Val	Phe	Asp	Gly	Ser	Val	Ile	Pro	Ser	Gly	Ile	Asp	Gly	Met	Pro	

100				105				110									
act	ctt	ctg	tat	acc	tct	gta	tca	tac	ctc	cca	atc	cac	tgg	tcc	atc	384	
Thr	Leu	Leu	Tyr	Thr	Ser	Val	Ser	Tyr	Leu	Pro	Ile	His	Trp	Ser	Ile		
115				120				125									
ccc	tac	acc	cgg	gga	agc	gag	aca	caa	tcc	ttg	gcc	gtt	tcc	tat	gac	432	
Pro	Tyr	Thr	Arg	Gly	Ser	Glu	Thr	Gln	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Tyr	Asp		
130				135				140									
ggt	ggt	cac	aac	ttc	acc	aag	ctc	aac	caa	ggg	ccc	gtg	atc	cct	acg	480	
Gly	Gly	His	Asn	Phe	Thr	Lys	Leu	Asn	Gln	Gly	Pro	Val	Ile	Pro	Thr		
145				150				155								160	
cct	cgg	ttt	gct	ctc	aat	gtc	acc	gct	ttc	cgt	gac	ccc	tac	gtt	ttc	528	
Pro	Pro	Phe	Ala	Leu	Asn	Val	Thr	Ala	Phe	Arg	Asp	Pro	Tyr	Val	Phe		
				165				170								175	
caa	agc	cca	att	ctg	gac	aaa	tct	gtc	aat	agt	acc	caa	gga	aca	tgg	576	
Gln	Ser	Pro	Ile	Leu	Asp	Lys	Ser	Val	Asn	Ser	Thr	Gln	Gly	Thr	Trp		
180				185				190									
tat	gtc	gcc	ata	tct	ggc	ggt	gtc	cac	ggt	gtc	gga	cct	tgt	cag	ttc	624	
Tyr	Val	Ala	Ile	Ser	Gly	Gly	Val	His	Gly	Val	Gly	Pro	Cys	Gln	Phe		
195				200				205									
ctc	tac	cgt	cag	aac	gac	gca	gat	ttt	caa	tat	tgg	gaa	tat	ctc	ggg	672	
Leu	Tyr	Arg	Gln	Asn	Asp	Ala	Asp	Phe	Gln	Tyr	Trp	Glu	Tyr	Leu	Gly		
210				215				220									
caa	tgg	tgg	aag	gag	ccc	ctt	aat	acc	act	tgg	gga	aag	ggt	gac	tgg	720	
Gln	Trp	Trp	Lys	Glu	Pro	Leu	Asn	Thr	Thr	Trp	Gly	Lys	Gly	Asp	Trp		
225				230				235								240	
gcc	ggg	ggt	tgg	ggc	ttc	aac	ttt	gag	gtt	ggc	aac	gtc	ttt	agt	ctg	768	
Ala	Gly	Gly	Trp	Gly	Phe	Asn	Phe	Glu	Val	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Leu		
				245				250								255	
aat	gca	gag	ggg	tat	agt	gaa	gac	ggc	gag	ata	ttc	ata	acc	ctc	ggt	816	
Asn	Ala	Glu	Gly	Tyr	Ser	Glu	Asp	Gly	Glu	Ile	Phe	Ile	Thr	Leu	Gly		
260				265				270									
gct	gag	ggt	tcg	gga	ctt	ccc	atc	gtt	cct	caa	gtc	tcc	tct	att	cgc	864	
Ala	Glu	Gly	Ser	Gly	Leu	Pro	Ile	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Ser	Ile	Arg		
275				280				285									
gat	atg	ctg	tgg	gtg	acc	ggc	aat	gtc	aca	aat	gac	ggc	tct	gtc	act	912	
Asp	Met	Leu	Trp	Val	Thr	Gly	Asn	Val	Thr	Asn	Asp	Gly	Ser	Val	Thr		
290				295				300									

t t c	a a g	c c a	a c c	a t g	g c g	g g t	g t g	c t t	g a c	t g g	g g c	g t g	t c g	g c a	t a t	9 6 0
P h e	L y s	P r o	T h r	M e t	A l a	G l y	V a l	L e u	A s p	T r p	G l y	V a l	S e r	A l a	T y r	
3 0 5					3 1 0					3 1 5					3 2 0	
g c t	g c t	g c a	g g c	a a g	a t c	t t g	c c g	g c c	a g c	t c t	c a g	g c a	t c c	a c a	a a g	1 0 0 8
A l a	A l a	A l a	G l y	L y s	I l e	L e u	P r o	A l a	S e r	S e r	G l n	A l a	S e r	T h r	L y s	
				3 2 5					3 3 0					3 3 5		
a g c	g g t	g c c	c c c	g a t	c g g	t t c	a t t	t c c	t a t	g t c	t g g	c t c	a c t	g g a	g a t	1 0 5 6
S e r	G l y	A l a	P r o	A s p	A r g	P h e	I l e	S e r	T y r	V a l	T r p	L e u	T h r	G l y	A s p	
			3 4 0					3 4 5					3 5 0			
c t a	t t c	g a g	c a a	g t g	a a a	g g a	t t c	c c t	a c c	g c t	c a a	c a a	a a c	t g g	a c c	1 1 0 4
L e u	P h e	G l u	G l n	V a l	L y s	G l y	P h e	P r o	T h r	A l a	G l n	G l n	A s n	T r p	T h r	
		3 5 5					3 6 0					3 6 5				
g g g	g c c	c t c	t t a	c t g	c c g	c g a	g a g	c t g	a a t	g t c	c g c	a c t	a t c	t c t	a a c	1 1 5 2
G l y	A l a	L e u	L e u	L e u	P r o	A r g	G l u	L e u	A s n	V a l	A r g	T h r	I l e	S e r	A s n	
	3 7 0					3 7 5				3 8 0						
g t g	g t g	g a t	a a c	g a a	c t t	t c g	c g t	g a g	t c c	t t g	a c a	t c g	t g g	c g c	g t g	1 2 0 0
V a l	V a l	A s p	A s n	G l u	L e u	S e r	A r g	G l u	S e r	L e u	T h r	S e r	T r p	A r g	V a l	
3 8 5					3 9 0					3 9 5					4 0 0	
g c c	c g c	g a a	g a c	t c t	g g t	c a g	a t c	g a c	c t t	g a a	a c a	a t g	g g a	a t c	t c a	1 2 4 8
A l a	A r g	G l u	A s p	S e r	G l y	G l n	I l e	A s p	L e u	G l u	T h r	M e t	G l y	I l e	S e r	
				4 0 5					4 1 0					4 1 5		
a t t	t c c	a g g	g a g	a c t	t a c	a g c	g c t	c t c	a c a	t c c	g g c	t c a	t c t	t t t	g t c	1 2 9 6
I l e	S e r	A r g	G l u	T h r	T y r	S e r	A l a	L e u	T h r	S e r	G l y	S e r	S e r	P h e	V a l	
			4 2 0					4 2 5					4 3 0			
g a g	t c t	g g t	a a a	a c g	t t g	t c g	a a t	g c t	g g a	g c a	g t g	c c c	t t c	a a t	a c c	1 3 4 4
G l u	S e r	G l y	L y s	T h r	L e u	S e r	A s n	A l a	G l y	A l a	V a l	P r o	P h e	A s n	T h r	
		4 3 5					4 4 0					4 4 5				
t c a	c c c	t c a	a g c	a a g	t t c	t t c	g t g	c t g	a c a	g c a	a a t	a t a	t c t	t t c	c c g	1 3 9 2
S e r	P r o	S e r	S e r	L y s	P h e	P h e	V a l	L e u	T h r	A l a	A s n	I l e	S e r	P h e	P r o	
	4 5 0					4 5 5					4 6 0					
a c c	t c t	g c c	c g t	g a c	t c t	g g c	a t c	c a g	g c t	g g t	t t c	c a g	g t t	t t a	t c c	1 4 4 0
T h r	S e r	A l a	A r g	A s p	S e r	G l y	I l e	G l n	A l a	G l y	P h e	G l n	V a l	L e u	S e r	
4 6 5					4 7 0					4 7 5					4 8 0	
t c t	a g t	c t t	g a g	t c t	a c a	a c t	a t c	t a c	t a c	c a a	t t c	t c c	a a c	g a g	t c c	1 4 8 8
S e r	S e r	L e u	G l u	S e r	T h r	T h r	I l e	T y r	T y r	G l n	P h e	S e r	A s n	G l u	S e r	
				4 8 5				4 9 0						4 9 5		
a t c	a t c	g t c	g a c	c g c	a g c	a a c	a c g	a g t	g c t	g c g	g c g	a g a	a c a	a c t	g c t	1 5 3 6
I l e	I l e	V a l	A s p	A r g	S e r	A s n	T h r	S e r	A l a	A l a	A l a	A r g	T h r	T h r	A l a	

500

505

510

g g g	a t c	c t c	a g t	g a t	a a c	g a g	g c g	g g a	c g t	c t g	c g c	c t c	t t c	g a c	g t g	1584
Gly	Ile	Leu	Ser	Asp	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg	Leu	Arg	Leu	Phe	Asp	Val	
		515					520					525				

t t g	c g a	a a t	g g a	a a a	g a a	c a g	g t t	g a a	a c t	t t g	g a g	c t c	a c t	a t c	g t g	1632
Leu	Arg	Asn	Gly	Lys	Glu	Gln	Val	Glu	Thr	Leu	Glu	Leu	Thr	Ile	Val	
	530					535					540					

g t g	g a t	a a t	a g t	g t a	c t g	g a a	g t a	t a t	g c c	a a t	g g a	c g c	t t t	g c t	c t a	1680
Val	Asp	Asn	Ser	Val	Leu	Glu	Val	Tyr	Ala	Asn	Gly	Arg	Phe	Ala	Leu	
545					550					555					560	

g g c	a c t	t g g	g c t	c g g	t c t	t g g	t a c	g c c	a a c	t c g	a c t	a a a	a t t	a a c	t t c	1728
Gly	Thr	Trp	Ala	Arg	Ser	Trp	Tyr	Ala	Asn	Ser	Thr	Lys	Ile	Asn	Phe	
				565					570					575		

t t c	c a t	a a c	g g c	g t g	g g a	g a a	g c g	a c a	t t c	g a a	g a t	g t g	a c g	g t c	t t t	1776
Phe	His	Asn	Gly	Val	Gly	Glu	Ala	Thr	Phe	Glu	Asp	Val	Thr	Val	Phe	
			580					585					590			

g a a	g g a	c t g	t a t	g a t	g c c	t g g	c c a	c a a	a g g	a a g						1809
Glu	Gly	Leu	Tyr	Asp	Ala	Trp	Pro	Gln	Arg	Lys						
		595					600									

<210> 4

<211> 603

<212> PRT

<213> Penicillium roqueforti

<400> 4

Val	Asp	Phe	His	Thr	Pro	Ile	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ala	Pro	Pro	Asn	Leu
1				5					10					15	

Ser	Thr	Leu	Ala	Asn	Ala	Ser	Leu	Phe	Lys	Thr	Trp	Arg	Pro	Arg	Ala
			20					25					30		

His	Leu	Leu	Pro	Pro	Ser	Gly	Asn	Ile	Gly	Asp	Pro	Cys	Gly	His	Tyr
		35					40					45			

Thr	Asp	Pro	Lys	Thr	Gly	Leu	Phe	His	Val	Gly	Trp	Leu	Tyr	Ser	Gly
	50					55					60				

Ile	Ser	Gly	Ala	Thr	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Thr	Tyr	Lys	Asp	Leu	Asn
65					70					75					80

Pro	Asp	Gly	Ala	Pro	Ser	Ile	Val	Ala	Gly	Gly	Lys	Asn	Asp	Pro	Leu
				85					90					95	

Ser	Val	Phe	Asp	Gly	Ser	Val	Ile	Pro	Ser	Gly	Ile	Asp	Gly	Met	Pro	
			100					105					110			
Thr	Leu	Leu	Tyr	Thr	Ser	Val	Ser	Tyr	Leu	Pro	Ile	His	Trp	Ser	Ile	
		115					120					125				
Pro	Tyr	Thr	Arg	Gly	Ser	Glu	Thr	Gln	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Tyr	Asp	
	130					135					140					
Gly	Gly	His	Asn	Phe	Thr	Lys	Leu	Asn	Gln	Gly	Pro	Val	Ile	Pro	Thr	
145					150					155					160	
Pro	Pro	Phe	Ala	Leu	Asn	Val	Thr	Ala	Phe	Arg	Asp	Pro	Tyr	Val	Phe	
			165						170					175		
Gln	Ser	Pro	Ile	Leu	Asp	Lys	Ser	Val	Asn	Ser	Thr	Gln	Gly	Thr	Trp	
			180					185					190			
Tyr	Val	Ala	Ile	Ser	Gly	Gly	Val	His	Gly	Val	Gly	Pro	Cys	Gln	Phe	
		195					200					205				
Leu	Tyr	Arg	Gln	Asn	Asp	Ala	Asp	Phe	Gln	Tyr	Trp	Glu	Tyr	Leu	Gly	
	210					215					220					
Gln	Trp	Trp	Lys	Glu	Pro	Leu	Asn	Thr	Thr	Trp	Gly	Lys	Gly	Asp	Trp	
225					230					235					240	
Ala	Gly	Gly	Trp	Gly	Phe	Asn	Phe	Glu	Val	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Leu	
			245						250					255		
Asn	Ala	Glu	Gly	Tyr	Ser	Glu	Asp	Gly	Glu	Ile	Phe	Ile	Thr	Leu	Gly	
		260						265					270			
Ala	Glu	Gly	Ser	Gly	Leu	Pro	Ile	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Ser	Ile	Arg	
		275					280					285				
Asp	Met	Leu	Trp	Val	Thr	Gly	Asn	Val	Thr	Asn	Asp	Gly	Ser	Val	Thr	
	290					295					300					
Phe	Lys	Pro	Thr	Met	Ala	Gly	Val	Leu	Asp	Trp	Gly	Val	Ser	Ala	Tyr	
305					310					315					320	
Ala	Ala	Ala	Gly	Lys	Ile	Leu	Pro	Ala	Ser	Ser	Gln	Ala	Ser	Thr	Lys	
			325						330					335		
Ser	Gly	Ala	Pro	Asp	Arg	Phe	Ile	Ser	Tyr	Val	Trp	Leu	Thr	Gly	Asp	
		340						345					350			
Leu	Phe	Glu	Gln	Val	Lys	Gly	Phe	Pro	Thr	Ala	Gln	Gln	Asn	Trp	Thr	

355

360

365

Gly	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Arg	Glu	Leu	Asn	Val	Arg	Thr	Ile	Ser	Asn		
370						375						380					
Val	Val	Asp	Asn	Glu	Leu	Ser	Arg	Glu	Ser	Leu	Thr	Ser	Trp	Arg	Val		
385				390				395						400			
Ala	Arg	Glu	Asp	Ser	Gly	Gln	Ile	Asp	Leu	Glu	Thr	Met	Gly	Ile	Ser		
				405						410						415	
Ile	Ser	Arg	Glu	Thr	Tyr	Ser	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Ser	Ser	Phe	Val		
			420					425						430			
Glu	Ser	Gly	Lys	Thr	Leu	Ser	Asn	Ala	Gly	Ala	Val	Pro	Phe	Asn	Thr		
		435				440				445							
Ser	Pro	Ser	Ser	Lys	Phe	Phe	Val	Leu	Thr	Ala	Asn	Ile	Ser	Phe	Pro		
450						455				460							
Thr	Ser	Ala	Arg	Asp	Ser	Gly	Ile	Gln	Ala	Gly	Phe	Gln	Val	Leu	Ser		
465				470						475				480			
Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Thr	Thr	Ile	Tyr	Tyr	Gln	Phe	Ser	Asn	Glu	Ser		
				485						490						495	
Ile	Ile	Val	Asp	Arg	Ser	Asn	Thr	Ser	Ala	Ala	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala		
			500					505						510			
Gly	Ile	Leu	Ser	Asp	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg	Leu	Arg	Leu	Phe	Asp	Val		
515						520				525							
Leu	Arg	Asn	Gly	Lys	Glu	Gln	Val	Glu	Thr	Leu	Glu	Leu	Thr	Ile	Val		
530						535				540							
Val	Asp	Asn	Ser	Val	Leu	Glu	Val	Tyr	Ala	Asn	Gly	Arg	Phe	Ala	Leu		
545				550				555						560			
Gly	Thr	Trp	Ala	Arg	Ser	Trp	Tyr	Ala	Asn	Ser	Thr	Lys	Ile	Asn	Phe		
				565						570						575	
Phe	His	Asn	Gly	Val	Gly	Glu	Ala	Thr	Phe	Glu	Asp	Val	Thr	Val	Phe		
			580					585						590			
Glu	Gly	Leu	Tyr	Asp	Ala	Trp	Pro	Gln	Arg	Lys							
595						600											

<210> 5

<211> 1839

<213> Scopulariopsis brevicaulis

 $\langle 220 \rangle$ $\langle 221 \rangle$ CDS $\langle 222 \rangle \quad (1) \dots (1839)$ $\langle 400 \rangle$ 5

c a a c c t a c g t c t c t g t c a a t c g a c a a t t c c a c g t a t c c t t c t a t c g a c 48
G l n P r o T h r S e r L e u S e r I l e A s p A s n S e r T h r T y r P r o S e r I l e A s p
 1 5 10 15

t a c a a c t c c g c c c c t c c a a a c c t c t c g a c t c t t g c c a a c a a c a g c c t c 96
Tyr Asn Ser Ala Pro Pro Asn Leu Ser Thr Leu Ala Asn Asn Ser Leu
20 25 30

t t c g a g a c a t g g a g g c c g a g g g c a c a c g t c c t t c c g c c c c a g a a c c a g 144
Phe Glu Thr Trp Arg Pro Arg Ala His Val Leu Pro Pro Gln Asn Gln
 35 40 45

atc ggc gat ccg tgt atg cac tac acc gac ccc gag aca gga atc ttc 192
Ile Gly Asp Pro Cys Met His Tyr Thr Asp Pro Glu Thr Gly Ile Phe
50 55 60

cac gtc gcc tgg ctg tac aac gcc aat gcc gct tcc gcc gcc acg acc 240
His Val Gly Trp Leu Tyr Asn Gly Asn Gly Ala Ser Gly Ala Thr Thr
65 70 75 80

gag gat ctc gtc acc tat cag gat ctc aac ccc gac gga gcg cag atg 288
Glu Asp Leu Val Thr Tyr Gln Asp Leu Asn Pro Asp Gly Ala Gln Met

85 90 95

atc ctt ccg ggt ggt gtg aat gac ccc att gct gtc ttt gac ggc gcg 336
Ile Leu Pro Gly Gly Val Asn Asp Pro Ile Ala Val Phe Asp Gly Ala
100 105 110

g t t a t t c c c a g t g g c a t t g a t g g g a a a c c c a c c a t g a t g t a t a c c t c g 384
Val Ile Pro Ser Gly Ile Asp Gly Lys Pro Thr Met Met Tyr Thr Ser
 115 120 125

g t g t c a t a c a t g c c c a t c t c c t g g a g c a t c g c t t a c a c c a g g g g a a g c 432
Val Ser Tyr Met Pro Ile Ser Trp Ser Ile Ala Tyr Thr Arg Gly Ser
130 135 140

g a g a c c c a c t c t c t c g c a g t g t c g t c c g a c g g c g g t a a g a a c t t c a c c 480
Glu Thr His Ser Leu Ala Val Ser Ser Asp Gly Gly Lys Asn Phe Thr
145 150 155 160

a a g c t g g t g c a g g g c c c c g t c a t t c c t t c g c c t c c c t t c g g c g c c a a c 528
Lys Leu Val Gln Gly Pro Val Ile Pro Ser Pro Pro Phe Gly Ala Asn

165				170				175									
gtg	acc	agc	tgg	cgt	gac	ccc	ttc	ctg	ttc	caa	aac	ccc	cag	ttc	gac	576	
Val	Thr	Ser	Trp	Arg	Asp	Pro	Phe	Leu	Phe	Gln	Asn	Pro	Gln	Phe	Asp		
180				185				190									
tct	ctc	ctc	gaa	agc	gag	aac	ggc	acg	tgg	tac	acc	gtt	atc	tct	ggt	624	
Ser	Leu	Leu	Glu	Ser	Glu	Asn	Gly	Thr	Trp	Tyr	Thr	Val	Ile	Ser	Gly		
195				200				205									
ggc	atc	cac	ggt	gac	ggc	ccc	tcc	gcg	ttc	ctc	tac	cgt	cag	cac	gac	672	
Gly	Ile	His	Gly	Asp	Gly	Pro	Ser	Ala	Phe	Leu	Tyr	Arg	Gln	His	Asp		
210				215				220									
ccc	gac	ttc	cag	tac	tgg	gag	tac	ctt	gga	ccg	tgg	tgg	aac	gag	gaa	720	
Pro	Asp	Phe	Gln	Tyr	Trp	Glu	Tyr	Leu	Gly	Pro	Trp	Trp	Asn	Glu	Glu		
225				230				235								240	
ggg	aac	tcg	acc	tgg	ggc	agc	ggt	gac	tgg	gct	ggc	cgg	tgg	ggc	tac	768	
Gly	Asn	Ser	Thr	Trp	Gly	Ser	Gly	Asp	Trp	Ala	Gly	Arg	Trp	Gly	Tyr		
245				250				255									
aac	ttc	gag	gtc	atc	aac	att	gtc	ggt	ctt	gac	gat	gat	ggc	tac	aac	816	
Asn	Phe	Glu	Val	Ile	Asn	Ile	Val	Gly	Leu	Asp	Asp	Asp	Gly	Tyr	Asn		
260				265				270									
ccc	gac	ggt	gaa	atc	ttt	gcc	acg	gta	ggt	acc	gaa	tgg	tcg	ttt	gac	864	
Pro	Asp	Gly	Glu	Ile	Phe	Ala	Thr	Val	Gly	Thr	Glu	Trp	Ser	Phe	Asp		
275				280				285									
ccc	atc	aaa	ccg	cag	gcc	tcg	gac	aac	agg	gag	atg	ctc	tgg	gcc	gcg	912	
Pro	Ile	Lys	Pro	Gln	Ala	Ser	Asp	Asn	Arg	Glu	Met	Leu	Trp	Ala	Ala		
290				295				300									
ggc	aac	atg	act	ctc	gag	gac	ggc	gat	atc	aag	ttc	acg	cca	agc	atg	960	
Gly	Asn	Met	Thr	Leu	Glu	Asp	Gly	Asp	Ile	Lys	Phe	Thr	Pro	Ser	Met		
305				310				315								320	
gcg	ggc	tac	ctc	gac	tgg	ggt	cta	tcg	gcg	tat	gcc	gcc	gct	ggc	aag	1008	
Ala	Gly	Tyr	Leu	Asp	Trp	Gly	Leu	Ser	Ala	Tyr	Ala	Ala	Ala	Gly	Lys		
325				330				335									
gag	ctg	ccc	gct	tct	tca	aag	cct	tcg	cag	aag	agc	ggt	gcg	ccg	gac	1056	
Glu	Leu	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	Ser	Gln	Lys	Ser	Gly	Ala	Pro	Asp		
340				345				350									
cgg	ttc	gtg	tcg	tac	ctg	tgg	ctc	acc	ggt	gac	tac	ttc	gag	ggc	cac	1104	
Arg	Phe	Val	Ser	Tyr	Leu	Trp	Leu	Thr	Gly	Asp	Tyr	Phe	Glu	Gly	His		
355				360				365									

gac	ttc	ccc	acc	ccg	cag	cag	aat	tgg	acc	ggc	tcg	ctt	ttg	ctt	ccg	1152
Asp	Phe	Pro	Thr	Pro	Gln	Gln	Asn	Trp	Thr	Gly	Ser	Leu	Leu	Leu	Pro	
	370						375				380					
cgt	gag	ctg	agc	gtc	ggg	acg	att	ccc	aac	gtt	gtc	gac	aac	gag	ctt	1200
Arg	Glu	Leu	Ser	Val	Gly	Thr	Ile	Pro	Asn	Val	Val	Asp	Asn	Glu	Leu	
385					390					395					400	
gct	cgc	gag	acg	ggc	tct	tgg	agg	gtt	ggc	acc	aac	gac	act	ggc	gtg	1248
Ala	Arg	Glu	Thr	Gly	Ser	Trp	Arg	Val	Gly	Thr	Asn	Asp	Thr	Gly	Val	
				405					410					415		
ctt	gag	ctg	gtc	act	ctg	aag	cag	gag	att	gct	cgc	gag	acg	ctg	gct	1296
Leu	Glu	Leu	Val	Thr	Leu	Lys	Gln	Glu	Ile	Ala	Arg	Glu	Thr	Leu	Ala	
			420					425					430			
gaa	atg	acc	agc	ggc	aac	tcc	ttc	acc	gag	gcg	agc	agg	aat	gtc	agc	1344
Glu	Met	Thr	Ser	Gly	Asn	Ser	Phe	Thr	Glu	Ala	Ser	Arg	Asn	Val	Ser	
		435					440					445				
tcg	ccc	gga	tct	acc	gcc	ttc	cag	cag	tcc	ctg	gat	tcc	aag	ttc	ttc	1392
Ser	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala	Phe	Gln	Gln	Ser	Leu	Asp	Ser	Lys	Phe	Phe	
	450					455					460					
gtc	ctg	acc	gcc	tcg	ctc	tcc	ttc	cct	tcg	tcg	gct	cgc	gac	tcc	gac	1440
Val	Leu	Thr	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	Pro	Ser	Ser	Ala	Arg	Asp	Ser	Asp	
465					470					475					480	
ctc	aag	gct	ggg	ttc	gag	atc	ctg	tcg	tcc	gag	ttt	gag	tcg	acc	acg	1488
Leu	Lys	Ala	Gly	Phe	Glu	Ile	Leu	Ser	Ser	Glu	Phe	Glu	Ser	Thr	Thr	
			485					490						495		
gtc	tac	tac	cag	ttt	tcc	aac	gag	tcc	atc	atc	att	gac	cgg	agc	aac	1536
Val	Tyr	Tyr	Gln	Phe	Ser	Asn	Glu	Ser	Ile	Ile	Ile	Asp	Arg	Ser	Asn	
			500					505					510			
tcg	agt	gct	gcc	gcc	ttg	act	acc	gat	gga	atc	gac	acc	cgc	aac	gag	1584
Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Leu	Thr	Thr	Asp	Gly	Ile	Asp	Thr	Arg	Asn	Glu	
		515					520					525				
ttt	ggc	aag	atg	cgc	ctg	ttt	gat	gtt	gtc	gag	ggg	gac	cag	gag	cgt	1632
Phe	Gly	Lys	Met	Arg	Leu	Phe	Asp	Val	Val	Glu	Gly	Asp	Gln	Glu	Arg	
	530					535					540					
atc	gag	acg	ctc	gat	ctc	act	att	gtg	gtt	gat	aac	tcg	atc	gtt	gag	1680
Ile	Glu	Thr	Leu	Asp	Leu	Thr	Ile	Val	Val	Asp	Asn	Ser	Ile	Val	Glu	
545					550					555					560	
gtt	cat	gcc	aac	ggg	cga	ttc	gct	ctg	agc	act	tgg	gtt	cgt	tcg	tgg	1728
Val	His	Ala	Asn	Gly	Arg	Phe	Ala	Leu	Ser	Thr	Trp	Val	Arg	Ser	Trp	

565

570

575

tac	gag	tcg	tcc	aag	gac	atc	aag	ttc	ttc	cac	gat	ggc	gac	agc	acg	1776
Tyr	Glu	Ser	Ser	Lys	Asp	Ile	Lys	Phe	Phe	His	Asp	Gly	Asp	Ser	Thr	
			580					585					590			

gtt	cag	ttc	tcg	aac	atc	acc	gtc	tac	gag	gga	ctg	ttt	gac	gcc	tgg	1824
Val	Gln	Phe	Ser	Asn	Ile	Thr	Val	Tyr	Glu	Gly	Leu	Phe	Asp	Ala	Trp	
		595					600					605				

ccg	gag	cgg	gcc	agg												1839
Pro	Glu	Arg	Ala	Arg												
	610															

<210> 6

<211> 613

<212> PRT

<213> *Scopulariopsis brevicaulis*

<400> 6

Gln	Pro	Thr	Ser	Leu	Ser	Ile	Asp	Asn	Ser	Thr	Tyr	Pro	Ser	Ile	Asp	
1				5					10					15		

Tyr	Asn	Ser	Ala	Pro	Pro	Asn	Leu	Ser	Thr	Leu	Ala	Asn	Asn	Ser	Leu	
			20					25					30			

Phe	Glu	Thr	Trp	Arg	Pro	Arg	Ala	His	Val	Leu	Pro	Pro	Gln	Asn	Gln	
		35					40					45				

Ile	Gly	Asp	Pro	Cys	Met	His	Tyr	Thr	Asp	Pro	Glu	Thr	Gly	Ile	Phe	
	50					55					60					

His	Val	Gly	Trp	Leu	Tyr	Asn	Gly	Asn	Gly	Ala	Ser	Gly	Ala	Thr	Thr	
65					70				75						80	

Glu	Asp	Leu	Val	Thr	Tyr	Gln	Asp	Leu	Asn	Pro	Asp	Gly	Ala	Gln	Met	
				85					90					95		

Ile	Leu	Pro	Gly	Gly	Val	Asn	Asp	Pro	Ile	Ala	Val	Phe	Asp	Gly	Ala	
		100						105					110			

Val	Ile	Pro	Ser	Gly	Ile	Asp	Gly	Lys	Pro	Thr	Met	Met	Tyr	Thr	Ser	
		115					120					125				

Val	Ser	Tyr	Met	Pro	Ile	Ser	Trp	Ser	Ile	Ala	Tyr	Thr	Arg	Gly	Ser	
	130					135					140					

Glu	Thr	His	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Ser	Asp	Gly	Gly	Lys	Asn	Phe	Thr	
145					150					155					160	

Lys	Leu	Val	Gln	Gly	Pro	Val	Ile	Pro	Ser	Pro	Pro	Phe	Gly	Ala	Asn	
				165					170					175		
Val	Thr	Ser	Trp	Arg	Asp	Pro	Phe	Leu	Phe	Gln	Asn	Pro	Gln	Phe	Asp	
			180					185					190			
Ser	Leu	Leu	Glu	Ser	Glu	Asn	Gly	Thr	Trp	Tyr	Thr	Val	Ile	Ser	Gly	
		195					200					205				
Gly	Ile	His	Gly	Asp	Gly	Pro	Ser	Ala	Phe	Leu	Tyr	Arg	Gln	His	Asp	
	210					215					220					
Pro	Asp	Phe	Gln	Tyr	Trp	Glu	Tyr	Leu	Gly	Pro	Trp	Trp	Asn	Glu	Glu	
225					230					235					240	
Gly	Asn	Ser	Thr	Trp	Gly	Ser	Gly	Asp	Trp	Ala	Gly	Arg	Trp	Gly	Tyr	
				245					250					255		
Asn	Phe	Glu	Val	Ile	Asn	Ile	Val	Gly	Leu	Asp	Asp	Asp	Gly	Tyr	Asn	
			260					265					270			
Pro	Asp	Gly	Glu	Ile	Phe	Ala	Thr	Val	Gly	Thr	Glu	Trp	Ser	Phe	Asp	
		275					280					285				
Pro	Ile	Lys	Pro	Gln	Ala	Ser	Asp	Asn	Arg	Glu	Met	Leu	Trp	Ala	Ala	
	290					295					300					
Gly	Asn	Met	Thr	Leu	Glu	Asp	Gly	Asp	Ile	Lys	Phe	Thr	Pro	Ser	Met	
305					310					315					320	
Ala	Gly	Tyr	Leu	Asp	Trp	Gly	Leu	Ser	Ala	Tyr	Ala	Ala	Ala	Gly	Lys	
				325					330					335		
Glu	Leu	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	Ser	Gln	Lys	Ser	Gly	Ala	Pro	Asp	
			340					345					350			
Arg	Phe	Val	Ser	Tyr	Leu	Trp	Leu	Thr	Gly	Asp	Tyr	Phe	Glu	Gly	His	
		355					360					365				
Asp	Phe	Pro	Thr	Pro	Gln	Gln	Asn	Trp	Thr	Gly	Ser	Leu	Leu	Leu	Pro	
	370					375					380					
Arg	Glu	Leu	Ser	Val	Gly	Thr	Ile	Pro	Asn	Val	Val	Asp	Asn	Glu	Leu	
385					390					395					400	
Ala	Arg	Glu	Thr	Gly	Ser	Trp	Arg	Val	Gly	Thr	Asn	Asp	Thr	Gly	Val	
				405					410					415		
Leu	Glu	Leu	Val	Thr	Leu	Lys	Gln	Glu	Ile	Ala	Arg	Glu	Thr	Leu	Ala	

420

425

430

Glu Met Thr Ser Gly Asn Ser Phe Thr Glu Ala Ser Arg Asn Val Ser

435

440

445

Ser Pro Gly Ser Thr Ala Phe Gln Gln Ser Leu Asp Ser Lys Phe Phe

450

455

460

Val Leu Thr Ala Ser Leu Ser Phe Pro Ser Ser Ala Arg Asp Ser Asp

465

470

475

480

Leu Lys Ala Gly Phe Glu Ile Leu Ser Ser Glu Phe Glu Ser Thr Thr

485

490

495

Val Tyr Tyr Gln Phe Ser Asn Glu Ser Ile Ile Ile Asp Arg Ser Asn

500

505

510

Ser Ser Ala Ala Ala Leu Thr Thr Asp Gly Ile Asp Thr Arg Asn Glu

515

520

525

Phe Gly Lys Met Arg Leu Phe Asp Val Val Glu Gly Asp Gln Glu Arg

530

535

540

Ile Glu Thr Leu Asp Leu Thr Ile Val Val Asp Asn Ser Ile Val Glu

545

550

555

560

Val His Ala Asn Gly Arg Phe Ala Leu Ser Thr Trp Val Arg Ser Trp

565

570

575

Tyr Glu Ser Ser Lys Asp Ile Lys Phe Phe His Asp Gly Asp Ser Thr

580

585

590

Val Gln Phe Ser Asn Ile Thr Val Tyr Glu Gly Leu Phe Asp Ala Trp

595

600

605

Pro Glu Arg Ala Arg

610

<210> 7
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 7
gcgaattcat gaagctcacc actacca

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 8
gcggatcccg gtcaatttct ct 22

<210> 9
<211> 9
<212> DNA
<213> Aspergillus niger

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (9)

<400> 9
gac gag gac 9
Asp Glu Asp
1

<210> 10
<211> 9
<212> DNA
<213> Aspergillus niger

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (9)

<400> 10
ttc ctg ccc 9
Phe Leu Pro
1

<210> 11
<211> 9
<212> DNA
<213> Aspergillus niger

<220>
<221> CDS

<222> (1).. (9)

<400> 11
tcc atc ccc
Ser Ile Pro
1

9

<210> 12
<211> 9
<212> DNA
<213> Aspergillus niger

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (9)

<400> 12
gcc ttc gac
Ala Phe Asp
1

9

<210> 13
<211> 9
<212> DNA
<213> Aspergillus niger

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (9)

<400> 13
gtg tac ggc
Val Tyr Gly
1

9

<210> 14
<211> 9
<212> DNA
<213> Aspergillus niger

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (9)

<400> 14
gcc ctg cag
Ala Leu Gln

9

<210> 15
<211> 9
<212> DNA
<213> Aspergillus niger

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (9)

<400> 15
ttt t c g g a g
Phe Ser Glu
1

9

<210> 16
<211> 9
<212> DNA
<213> Aspergillus niger

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (9)

<400> 16
a t c g a c g a c
Ile Asp Asp
1

9

<210> 17
<211> 9
<212> DNA
<213> Aspergillus niger

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (9)

<400> 17
t t g a t g g g c
Leu Met Gly
1

9

<210> 18
<211> 9

<212> DNA
<213> Aspergillus niger

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(9)

<400> 18
gtc tgc ttg
Val Cys Leu
1

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 フラクトオリゴ糖の製造に適するように反応特性が改善された β -フルクトフラノシダーゼ変異体の提供。

【解決手段】 本発明によれば、特定のアミノ酸残基において変異を有する配列番号2に記載のアミノ酸配列またはその相同体からなる、 β -フルクトフラノシダーゼ変異体が提供される。

【選択図】 なし

出願人履歴

0 0 0 0 0 6 0 9 1

19900803

新規登録

東京都中央区京橋 2 丁目 4 番 1 6 号

明治製菓株式会社